The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ラット腎ヒスタミンーNーメチル基転移酵素の精製と腎における局在
Author(s)	福田, 博
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35993
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【17】

氏名・(本籍)	福田　博（ふくだ　ひろし）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第　8094　号
学位授与の日付	昭和63年3月25日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ラット腎ヒスタミン－N－メチル基転移酵素の精製と腎における局在**
論文審査委員	(主査) 教授　和田　博 (副査) 教授　吉田　博　教授　遠山　正彌

論文内容の要旨

［目　的］

ヒスタミンはヒスタミン－N－メチル基転移酵素（HMT，S－adenosylmethionine : histamine N－methyltransferase，E.C.2.1.1.8.）またはヒスタミナーゼ（ジアミン酸化酵素，DAO，diamine : oxygen oxidoreductase，E.C.1.4.3.6.）により代謝され，この二つの代謝経路の相対的な重要性は，動物種や組織によって異なっている。ラットの末梢組織ではヒスタミナーゼによる代謝がヒスタミンの主要な分解経路であると考えられているが，脳および腎臓ではヒスタミナーゼ活性が検出できず，HMTの高い活性が限局して存在していることから，これらの組織ではヒスタミンは専らメチル化経路によってのみ代謝されていると考えられる。脳のHMTは神経刺激伝達物質としてのヒスタミンの分解代謝に関与しており，また，腎臓のHMTはテストステロンにより誘導されることが知られているが，この酵素の生理的意義と細胞レベルでの局在に関しては知見に乏しい。そこで，ラット腎臓の本酵素を高度に精製し，酵素化学的な検討を加えるとともに，抗体を作成してHMTの細胞組織化学的な局在を検討するために本研究を行なった。

［方法ならびに成績］

1．HMT活性の測定

酵素反応は0.1mMのヒスタミンと0.25mMのS－アデノシルメチオニンを基質としてpH7.8，37℃で行ない，反応生生物であるN^{τ}－メチルヒスタミンを，今回新たに開発した高速液体クロマトグラフィーシステムにより定量した。高速液体クロマトグラフィーの固定相には弱酸性イオン交換体であるTSK－CM2SW（東ソー，4㎜I.D.×150㎜）を，移動相には，1.25%のイミダゾールと20%のアセトニト

リルを含む37.5mMクエン酸（pH6.8，流速1.0ml／min）を用い，カラムからの流出液にオンラインでオルトフタルアルデヒドと２－メルカプトエタノールを含むホウ酸緩衝液（pH10.5）を添加し，反応させて蛍光モニターで定量した。

２．ＨＭＴの精製

ウイスター系雄性ラット腎臓100ｇを，1.0mMのジチオスレイトールおよび1.0%のポリエチレングリコール－300を含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）でホモジェナイズした遠心上清を用い以下のような５段階のステップを経てＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動法で単一の蛋白バンドとなるまで精製した。

①硫安分画：40%～75%飽和。

②ＤＥＡＥ－セルロースカラムクロマトグラフィー（１）：０～2.0Mの食塩濃度勾配により溶出。

③ＤＥＡＥ－セルロースカラムクロマトグラフィー（２）：10mMのヒスタミンを含むリン酸ナトリウム緩衝液により溶出。

④アフィニティークロマトグラフィー：ＣＨ－セファロース４Ｂにヒスタミンを結合させた固定相を用い，５mMをヒスタミンを含むリン酸ナトリウム緩衝液で溶出。

⑤セファデックスＧ75ゲル濾過

精製最終標品の比活性は750nmol／min／mg蛋白で，精製倍率は3400倍（回収率24%）であった。ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動では分子量約29,000の位置に単一ピークとして認められ，未変性標品のゲル濾過法による分子量測定では約35,000の位置に溶出し，本酵素はおそらく分子量約３万のモノマーであると考えられる。

３．抗ＨＭＴ抗体の作成

精製ＨＭＴ150μｇを1.5mgのウシサイログロブリンとカルボジイミドで結合させ，これを100μｇのアジュバントペプチドを含む1.0mlの生理的食塩水に溶解し，等量のFreundの完全アジュバントと混合懸濁し，雄モルモットの足蹠および腹部皮内に投与した。その後２か月間にわたって，２週間毎に初回投与の半量の抗原を投与し，最終投与の１週間後に採血した。得られた抗血清7.7μℓで１nmol／minのＨＭＴ活性を50%阻害し，また，脳粗抽出液のＨＭＴ活性も阻害した。Ouchterlonyの二重拡散試験では精製ＨＭＴとの間に一本の沈降線を形成した。

４．ＨＭＴの免疫組織化学

ウイスター系雄性ラットをZamboni液を用いて灌流固定し，間接蛍光抗体法によってＨＭＴ免疫反応陽性構造を検索した。ラット腎臓では近位尿細管のみが陽性免疫反応を示し，糸球体，遠位尿細管，集合管には全く陽性反応を認めなかった。なお，脳組織についても検討したが，組織化学的に陽性反応を証明することはできなかった。

［総　　括］

１．高速液体クロマトグラフィーによる活性測定法およびヒスタミンをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーを開発し，ラット腎臓よりヒスタミン－Ｎ－メチル基転移酵素（ＨＭＴ）を約3400倍の精製で，ほぼ単一標品として純化した。

2．精製蛋白は分子量約30,000のモノマーであることが確認できた。

3．精製ＨＭＴをモルモットに免疫し特異抗体を作成した。この抗体は試験管内で腎臓および脳のＨＭＴ活性を阻害した。

4．この抗体を用いて間接蛍光抗体法により組織化学的検索を行い，腎臓では近位尿細管に特異的に陽性反応が認められたが，脳組織では陽性反応を検出することができなかった。

5．近位尿細管におけるＨＭＴは，ヒスタミンの分解排泄に関与していると考えられる。

論文の審査結果の要旨

ヒスタミンＮ－メチル基転移酵素は哺乳動物におけるヒスタミンの代謝に関与する重要な酵素である。本研究は，ヒスタミンをリガンドとするアフィニティークロマト法を開発し，ラット腎より単一標品として精製することに成功した。そしてその性質を調べ，分子量約３万のモノマーであることを明らかにした。さらに精製した本酵素のポリクロナル抗体を得，その抗体を用いた組織化学的検索により初めてそのラット腎近位尿細管における局在を明らかにした。この結果は従来より言われていた腎における本酵素活性の主体が血管に局在するという説を覆すものである。また，本抗体がラット腎及び脳の本酵素を同程度阻害することにより両部位の酵素が同一の抗体認識部位を持つことを明らかにした。

本研究により，ヒスタミンＮ－メチル基転移酵素の酵素学的性質と組織分布が明らかとなり，学位論文に値するものである。